

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-208996

(43)公開日 平成5年(1993)8月20日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 7/64	Z N A	7306-4H		
A 6 1 K 37/02	A B C	8314-4C		
	A B E			
	A E C			
C 1 2 N 1/14		A 7236-4B		

審査請求 未請求 請求項の数12(全 15 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平3-287501	(71)出願人	390032997 サンド・アクチエンゲゼルシャフト SANDOZ AKTIENGESELL SCHAFT スイス国シーエイチ-4002バーゼル・リヒ トシュトラーセ35
(22)出願日	平成3年(1991)11月1日	(72)発明者	スー・ヨン・コー イギリス、イングランド、エヌダブリュー 3・4エルワイ・ロンドン、ベルサイズ・ パーク・ガーデنز42番 フラット5
(31)優先権主張番号	9 0 2 3 8 5 9 . 3	(74)代理人	弁理士 青山 蓀 (外1名)
(32)優先日	1990年11月2日		
(33)優先権主張国	イギリス (GB)		
(31)優先権主張番号	9 0 2 3 9 7 2 . 4		
(32)優先日	1990年11月5日		
(33)優先権主張国	イギリス (GB)		
(31)優先権主張番号	9 0 2 3 9 7 0 . 8		
(32)優先日	1990年11月5日		
(33)優先権主張国	イギリス (GB)		

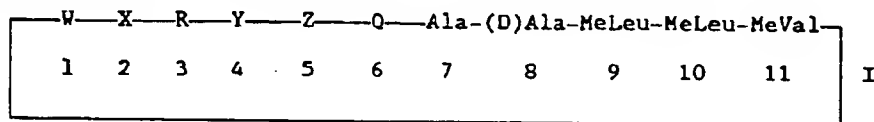
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規シクロスポリン類

(57)【要約】 (修正有)

\*リン、を含むエイズまたはエイズ関連障害処置剤。上記

【構成】 非免疫抑制、シクロフィリン結合シクロスポ\* シクロスポリンが



【式中、WはMeBmt、ジヒドロ-MeBmtまたは8'-ヒドロキシ-MeBmt; Xは $\alpha$ Abu、Val、Thr、Nva、またはMeOThr; RはSarまたは(D)-MeAla; YはMeLeu、 $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu、MeIle、MeVal、MeThr、MeAla、MeIle、またはMeaThr; ZはVal、Leu、MeVal、またはMeLeu\*

※u; およびQはMeLeu、 $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeuまたはMeAla; 但しYがMeLeuであるとき、ZはMeValまたはMeLeuであるかまたはWが8'-ヒドロキシ-MeBmtである]で示される化合物である剤。

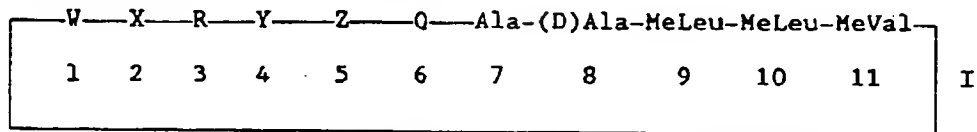
【効果】 エイズまたはエイズ関連疾患の処置に有効である。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 非免疫抑制、シクロフィリン結合シクロスポリンを含む、エイズまたはエイズ関連障害を処置するかまたは予防するための剤。

\*



【式中、WはMeBmt、ジヒドロ-MeBmtまたは8'-ヒドロキシ-MeBmt; Xは $\alpha$ Abu、Val、Thr、Nva、またはMeOThr; RはSarまたは(D)-MeAla; YはMeLeu、 $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu、MeIle、MeVal、MeThr、MeAla、MeIle、またはMeaThr; ZはVal、Leu、MeVal、またはMe

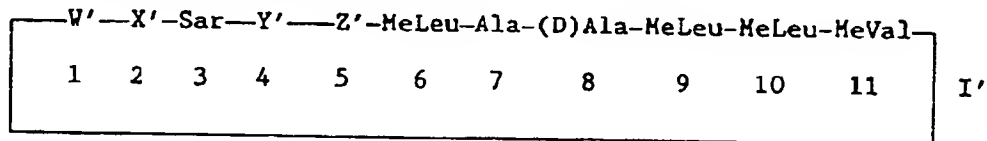
\* 【請求項2】 非免疫抑制、シクロフィリン結合シクロスポリンが、式I、

【化1】

※Leu; およびQはMeLeu、 $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeuまたはMeAla; 但しYがMeLeuであるとき、ZはMeValまたはMeLeuであるかまたはWが8'-ヒドロキシ-MeBmtである]で示される化合物である請求項1記載の剤。

【請求項3】 非免疫抑制シクロフィリン結合シクロスポリンが式I'

【化2】



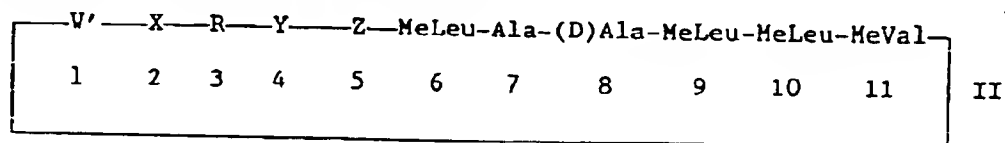
【式中、W'はMeBmtまたはジヒドロ-MeBmt; X'は $\alpha$ AbuまたはNva; Y'は $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu、MeVal、MeThrまたはMeIle; およびZ'はValまたはMeValである。】で示される化合物である請求項2記載の剤。

【請求項4】 非免疫抑制シクロフィリン結合シクロスポリンが、[ジヒドロ-MeBmt]<sup>1</sup>-[ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」、[MeVal]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」、[MeIle]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」、[MeThr]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」、[ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」、[Nva]<sup>2</sup>-[ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」、

★u)<sup>4</sup>-「シクロスポリン」、[ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu]<sup>4</sup>-[ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu]<sup>6</sup>-「シクロスポリン」、[MeVal]<sup>5</sup>-「シクロスポリン」、[MeOThr]<sup>2</sup>-[(D)MeAla]<sup>3</sup>-[MeVal]<sup>5</sup>-「シクロスポリン」、[8'-ヒドロキシ-MeBmt]<sup>1</sup>-「シクロスポリン」、[MeAla]<sup>6</sup>-「シクロスポリン」、および[ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu]<sup>9</sup>-「シクロスポリン」を含むグループから選択された化合物である請求項1記載の方法。

【請求項5】 1) 式II、

【化3】

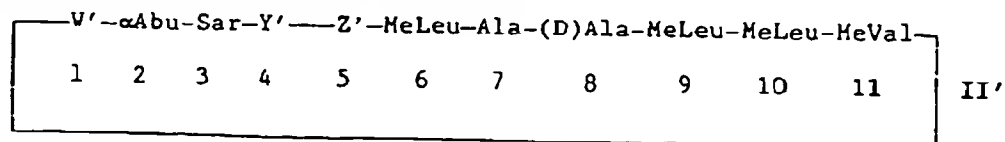


【式中、W'はMeBmtまたはジヒドロ-MeBmt; Xは $\alpha$ Abu、Val、Thr、NvaまたはMeOThr; RはSarまたは(D)-MeAla; YはMeLeu、 $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu、MeIle、MeVal、MeThr、MeAla、MeIleまたはMeaThr; およびZはVal、Leu、MeValまたはMeLeu; 但しYがMeLeuまたは☆

☆はMeAlaであるとき、ZがMeValまたはMeLeuであり、2) W'がMeBmt、RがSar、およびYが $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeuであるとき、ZはVal以外のものである]で示される化合物。

【請求項6】 式II'

【化4】



3

【式中、W' はMeBmtまたはジヒドロ-Me b m t ; Y' はγ-ヒドロキシ-MeLeu, MeVal, MeThrまたはMeIle; およびZ' はValまたはMeValである。但しW' がMeBmtであるとき、Y' はγ-ヒドロキシ-MeLeu以外のものである】で示される請求項5記載の化合物。

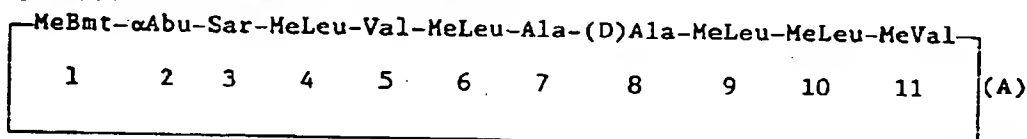
【請求項7】 [ジヒドロ-MeBmt]<sup>1</sup>- [γ-ヒドロキシ-MeLeu]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」、[MeVal]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」、[MeIle]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」、[MeThr]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」、[Nva]<sup>2</sup>- [γ-ヒドロキシ-MeLeu]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」、[γ-ヒドロキシ-MeLeu]<sup>4</sup>- [γ-ヒドロキシ-MeLeu]<sup>6</sup>-「シクロスポリン」、[MeVal]<sup>5</sup>-「シクロスポリン」、および[MeOThr]<sup>2</sup>- [(D)MeAla]<sup>3</sup>- [MeVal]<sup>5</sup>-「シクロスポリン」を含むグループから選択された化合物。

【請求項8】 製薬上許容し得る担体または希釈剤とともに請求項2、3、4、5、6、または7記載の化合物（但し化合物は[MeAla]<sup>6</sup>-「シクロスポリン」以外のものである）を含む医薬組成物。

【請求項9】 栄養培地中に真菌株DSM6627を培養し、発酵ブロスから生成物を単離することを含む[MeIle]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」の製造方法。

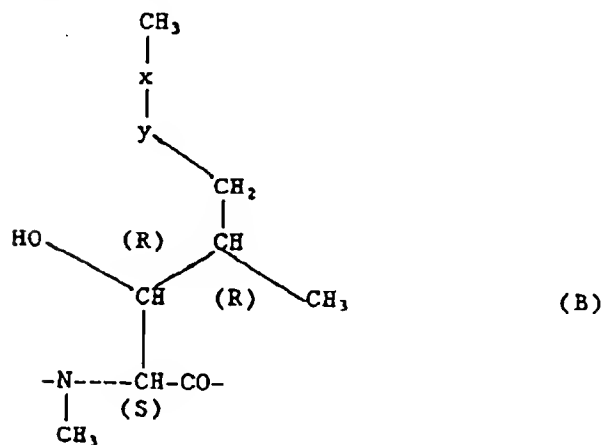
【請求項10】 真菌株DSM6627の純粋培養。

【請求項11】 栄養培地中に真菌株DSM6182を\*



【式中、MeBmtはN-メチル- (4R) -4-ブタ-2E-エン-1-イル-4-メチル- (L) スレオニル残基 (下式B)

【化6】



(式中、-x-yは-CH=CH- (トランス) であることを表わす) で示されるシクロスポリンである。

【0003】「シクロスポリン」の最初の発見以来、多※50

4

\*培養し、1個またはそれ以上のMeLeu残基をもつシクロスポリンを加え、発酵ブロスから生成物を単離することを含む、1個またはそれ以上のγ-ヒドロキシ-MeLeu残基を持つシクロスポリンの製造方法。

【請求項12】 真菌種DSM6182の純粋培養。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は新規シクロスポリン類、その医薬品としての用途およびそれらを含む医薬組成物、およびその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 シクロスポリン類 (Cyclosporins) は、構造上特徴ある、環状のポリ-N-メチル化されたウンデカペプチド系の、一般に薬学的、特に免疫抑制、抗炎症および/または駆虫活性を持つ一群の化合物を含む。最初に単離されたシクロスポリンは天然に生ずる真菌の代謝物、「シクロスポリン」 (Ciclosporin) または「シクロスポリン」 (Cyclosporin) であって、(本明細書では、これらを「シクロスポリン」で表わす) シクロスポリンA (cyclosporinA) としても知られ、サンディミュン (商標、SANDIMMUN) またはサンジミュン (商標、SANDIMMUNE) の登録商標名のもとに商業的に入手し得る。「シクロスポリン」は下式 (A)

【化5】

※数の天然に存在するシクロスポリン類が単離され、同定され、またさらに全合成または半合成手段、もしくは修飾培養技術の適用によって多数の非天然シクロスポリン類が製造された。したがって今日シクロスポリン系統群に含まれるものは多数存在し、例えば天然に存在するシクロスポリンAからZまで [トレーバーら、1、ヘルベチカ・キミカ・アクタ (Helv. Chim. Acta)、60巻、1247~1255頁 (1977); トレーバーら、2、ヘルベチカ・キミカ・アクタ、65巻、1655~1667頁 (1982年)、コベルら、ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・アプライド・マイクロバイオリジー (Europ. J. Applied Microbiology and Biotechnology)、14巻、273~240頁 (1982年) およびフォン・ワートバーグラ、プログレス・イン・アレルギー (Progress in Allergy)、38巻、28~45頁 (1986年) 参照]、およびさまざまな非天然シクロスポリン誘導体および人工または合成シクロスポリン類、例えばジヒドロシクロスポリン類 [MeBmt残基 (前記式B) の-x-y-部分を飽和して-x-y=-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-とする]、誘導体化したシ

5

クロスポリン類 [例えば MeBmt 残基の 3' - O - 原子をアシル化し、あるいは 3 - 位のサルコシル残基の  $\alpha$  炭素原子にさらに置換基を導入する]、MeBmt 残基が異性体形態で存在するクロスポリン類 [例えば MeBmt 残基の 6' および 7' 位との立体配置がトランスではなくシスである]、および例えば R. ウェグナーによって開発されたクロスポリン製造のための全合成方法を用いることによってペプチド配列内の特定位置に変異アミノ酸を挿入したクロスポリン類 [例えばトレーパーら、1、トレーパーら、2 およびコベルら (前掲)、米国特許第 4108985 号、同第 4220641 号、同第 4288431 号、4554351 号、同第 4396542 号、同第 4798823 号、ヨーロッパ特許公開第 34567A 号、同第 56782A 号、同第 300784A 号、同第 300785A 号、同第 414632A 号、国際特許公開 W086/02080 号、英国特許公開第 2206119 号および第 2207678 号、ウェグナー、1、トランスプランテーション・プロシーディングス (Transpl. Proc.)、15 巻、増刊 1 号、2230 頁 (1983 年)、ウェグナー、2、アンゲバンテ・ヒュミー・インターナショナル・エディション (Angew. Chem. Int. Ed.)、24 巻、77 頁 (1985 年) およびウェグナー、3、プログレス・イン・ザ・ケミストリー・オブ・オーガニック・ナチュラル・プロダクツ (Progress in the Chemistry Organic Natural Products)、50 巻、123 頁 (1986 年)] 等が挙げられる。

[0004] このように今日クロスポリン類に含まれる系統群は事実極めて多数に及び、例えば [Thr]<sup>2</sup> - [Val]<sup>2</sup> - [Nva]<sup>2</sup> および [Nva]<sup>2</sup> - [Nva]<sup>5</sup> - 「クロスポリン」 (それぞれクロスポリン C, D, G および M として知られている)、[3-O-アセチル-MeBmt]<sup>1</sup> - 「クロスポリン」 (クロスポリン A アセテートとして知られている)、[ジヒドロ-MeBmt]<sup>1</sup> - [Val]<sup>2</sup> - 「クロスポリン」 (ジヒドロクロスポリン D として知られている)、[(D) Ser]<sup>8</sup> - 「クロスポリン」、[Me Ile]<sup>11</sup> - 「クロスポリン」、[(D) Me Val]<sup>11</sup> - 「クロスポリン」 (クロスポリン H として知られている)、[Me Ala]<sup>6</sup> - 「クロスポリン」 および [(D) Pro]<sup>3</sup> - クロスポリン等が挙げられる。

[0005] クロスポリンのための通常の命名法によって、これらは本明細書および請求範囲において「クロスポリン」 (即ちクロスポリン A) の構造を引用して示す。この場合、まず「クロスポリン」 (Ciclosporin) に存在する残基と異なった分子内の残基を示し、ついで「クロスポリン (Ciclosporin)」の語を適用して「クロスポリン」に存在する残基と同一の残りの残基を表わす。同時に、接頭語「ジヒドロ」は MeBm

6

t 残基が水素化されている、即ち式 B で -x-y- が -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- である (ジヒドロ-MeBmt) シクロスポリン類を示すのに使用する。したがって [Thr]<sup>2</sup> - 「クロスポリン」とは、式 A で示される配列を有しているが 2 位の  $\alpha$  Abu が Thr で置き換えられているクロスポリンであり、[ジヒドロ-MeBmt]<sup>1</sup> - [Val]<sup>2</sup> - 「クロスポリン」とは、式 A で示される配列を有しているが 1 位の MeBmt 残基が水素化されており、2 位の  $\alpha$  Abu が Val で置き換えられているクロスポリンである。

[0006] また例えば Ala、MeVal、 $\alpha$  Abu 等の略号で示されるアミノ酸残基は、通常行なわれているように、例えば「(D) Ala」の場合のように特に示さない限り (L) - 配置を有するものと理解すべきである。「MeLeu」の場合のように、前に「Me」を付けた残基の略号は  $\alpha$ -N-メチル化した残基を表わす。クロスポリン分子の個々の残基は、1 位の MeBmt またはジヒドロ MeBmt またはジヒドロ MeBmt 残基から出発して時計回りの方向に数える。本明細書および請求範囲ではすべて同一の配列番号を使用する。

[0007] 現在、「クロスポリン」が IL-2 の転写開始を遮断することにより T 細胞の活性化過程を妨害することによって作用するということは確立されているが、明確なメカニズムはまだ解明されていない。「クロスポリン」は、多くの細胞型中に存在する 17 kD 細胞質ゾルの蛋白質 (シクロフィリン) との複合体を形成することが明かにされており、蛋白質折り畳み中に含まれる酵素である、ペプチジル-プロピル シス-トランス異性化酵素と等しいことも明らかにされている。しかしながら、これまでのところ、シクロフィリンとの結合がクロスポリン類の免疫抑制活性と直接関連しているかどうか、または実際にシクロフィリン結合がそれ自体免疫抑制活性に対する十分な判定規準であるかどうかは明かでない。

[0008] 現在、シクロフィリンと強力に結合しているが全く免疫抑制的ではないクロスポリン類があることはわかっている。したがって、シクロフィリンとの結合は、免疫活性にとって必要であるが、十分な判定規準ではないことになる。

[0009] この発明は HIV-1 複製に対して活性であるクロスポリン類を提供する。

[0010] ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は T-ヘルパー (T4) リンパ球に好んで感染するが、多様な他の細胞型、特に単球マクロファージにおいても複製する。それは、エイズ (AIDS) と名付けられる、漸次の T4-細胞破壊を特徴とする免疫機構の緩慢に進行する、エイズ (AIDS) と名付けられる疾患の原因となる。AIDS の他の免疫学的異常は細胞毒性/抑制 (T8) リンパ球の増加、抗原の提示/認識過程および B-細胞のポリクローナル活性における欠陥である。T4-細胞破壊

7

のメカニズムはまだ明かでない。比較的少数のT4細胞だけが感染しているようなので、ウイルスによって生じる直接の細胞変性効果はT4細胞消耗の唯一の原因では有り得ない。T4細胞破壊は、HIV生成またはHIV-蛋白-被覆T4細胞によって引き起こされる自己免疫過程によって増幅されるという仮説が立てられてきた。この持続的な抗原刺激は、T4細胞の永続的な活性化状態をもたらすが、これはT4細胞中のHIV複製を増大させ、T細胞毒性クローンを拡大させることになる。感染していないT4細胞は外因性ウイルスgp120をそれらのCD4分子を結合させることによって抗原にされ、したがってT細胞毒性応答の標的になる。

【0011】米国特許第4814323号は、「シクロスポリン」がAIDSに対して活性をもち、一般に“免疫抑制剤として知られるシクロスポリン類”がこの指示に有用で有り得ることを開示している。非免疫抑制シクロスポリン類がこの属性をもつことが期待されるということは示唆されていない。

【0012】

【発明の構成】驚くべき事だが、シクロフィリンに結合して免疫抑制的ではないシクロスポリン類が、HIV-1複製に抑制効果を示すということが現在判ってきた。

【0013】シクロスポリンは、ケスノー (Quesniaux) によりヨーロッパ・ジャーナル・オブ・イムノロジー (Eur. J. Immunol.) 1987年、17巻、1359-1365頁に記載されている競合的ELISAテストにおける「シクロスポリン」のようにヒト組み替えシクロフィリンと最低5分の1結合するとシクロフィリンと結合するとみなされる。この試験では、試験されるシクロスポリンをシクロフィリンと被覆されたBSA「シクロスポリン」のインキュベーション中に加え、競争者なしの対照反応を50%阻止するのに必要な濃度を計算する (IC<sub>50</sub>)。結果は結合率 (BR) として表わし、それはこの試験化合物および「シクロスポリン」それ自体の同時試験でのIC<sub>50</sub>の比率の底10に対する対数である。したがって、BR1.0は、試験化合物がシクロフィリンと「シクロスポリン」の結合の10分の1ファクター以下で結合していることを示し、負の値は結合が「シクロスポリン」のものより強いことを示している。

【0014】HIVに対して活性なシクロスポリンは、0.7以下のBRをもち (log<sub>10</sub>5=約0.7であるから)、好ましくはゼロと等しいかまたはゼロより低い。

【0015】シクロスポリンは、「シクロスポリン」の5%以下、好ましくは2%以下の混合リンパ球反応 (MIR) における活性をもつときに非免疫抑制的であるとみなされる。混合リンパ球反応はT.メオの“イムノロジカル・メソズ (Immunological Method) ”、L.レフコヴィツおよびB.ペリス編、アカデミック・プレ

8

ス・ニューヨーク (Academic Press, N. Y.) 227-239頁 (1979年) に記載されている。近交系マウス (メス、8-10週) の脾臓細胞 (0.5 x 10<sup>6</sup>) を、CBAマウス (メス、8-10週) の0.5 x 10<sup>6</sup>の照射 (2000ラッド) またはマイトマイシンC処置された脾臓細胞とともに5日間インキュベートする。照射された同種の (異系の) 細胞は近交系マウスの脾臓細胞内の増殖反応を誘導するが、それはDNA内への標識化前駆体組み込みによって測定し得る。刺激細胞は照射 (またはマイトマイシンC処置) されるので、近交系マウスの細胞に増殖応答せず、それらの抗原性を保つ。MLRにおける試験化合物でみられるIC<sub>50</sub>を、平行実験でのシクロスポリン (Ciclosporin) でみられるものと比較する。

【0016】HIV-1複製の抑制剤としてのシクロスポリン類の活性を下記の試験方法で示す。

1. MT4細胞におけるHIV-1誘導細胞変性効果の抑制

パウエルら、ジャーナル・オブ・バイロロジカル・メソズ (J. Virol. Meth.) 20/309 (1988

年) に記載されているアッセイ方法を最小限に修正して用いる。前もってHIV感染に対して高い許容性を示したHTLV-I-形質転換T4細胞、MT4を標的細胞として用いる。HIV-1の抑制、株HIV-IIIB-誘導細胞変性効果を、HIV感染および模擬 (mock) 感染の両細胞の生存率を測定することによって測定する。生存率を3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド

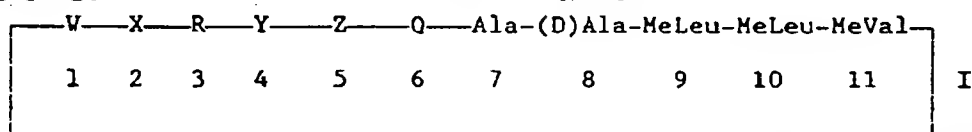
(MTT) のその場所での還元によって分光光度計により評価する。化合物で処置された非感染の細胞と、化合物で処置されていないウイルス感染および非感染培養を対照として入れる。1mlあたりの細胞数が模擬感染培養における4日間のインキュベーション中に10倍に増加するように細胞濃度を選択する。4日間のインキュベーションの後、標的細胞の90%で細胞死を生じるようにウイルスの接種を調整する。ウイルスを、10倍に濃縮した細胞懸濁液に37℃で1時間吸着させる。次に、感染した細胞を1:10に希釈し、試験化合物を入れた微量滴定皿に加える。

2. 細胞毒性

別の細胞、具体的には系単球細胞系 (U937) における抗HIV能力を評価するために、これらの細胞系に対する試験化合物の細胞毒性を最初に評価する。JurkatおよびU937細胞懸濁液を1 x 10<sup>5</sup>に調整し、様々な濃度の試験化合物の存在下でインキュベートする。48時間後、1mlあたりの細胞量をMTTで染色して比較する。MT4細胞での細胞毒性を同様に測定する。3. ユルクット (Jurkat) およびU937細胞におけるHIV-1複製の抑制T4細胞系Jurkatおよび単球細胞系U937を、ウイルス溶液中で10倍に濃縮

10

【0018】多くの活性化化合物が「シクロスポリン」と4および/または5位において特異的に異なる構造をもつことがわかっている。



【0022】W、X、Y、Z、QおよびRの基は、個別に、下記の好ましい意味をもつ。Wは、W' がMeBmtまたはジヒドロMeBmtであるとき、好ましくはW' である。Xは、好ましくはX' が $\alpha$ AbuまたはNvaであるときX' であり、より好ましくはX" が $\alpha$ AbuであるときX" である。Rは好ましくは、R' がSarであるときR' である。Yは好ましくは、Y' が $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu、MVal、MeThrまたはMeIleであるときY' である。Zは、好ましくは、Z' がValまたはMeValであるときZ' である。Qは、好ましくは、Q' がMeLeuであるときQ' である。

【0021】追加または選択的に、ある種の活性化化合物は「シクロスポリン」と1、2、3および／または6位で異なり得る。活性化化合物の好ましい群は、式I

【化7】

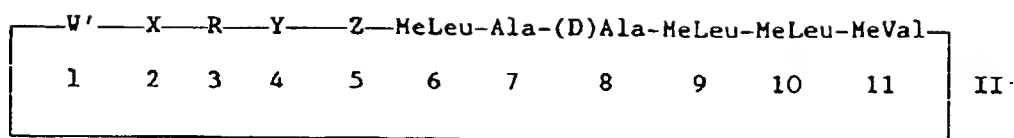
【0023】加えて、式Iの範囲内にないある種の化合物、例えばk)  $[\text{MeAla}]^{\oplus}$  - 「シクロスポリン」およびl)  $[\gamma\text{-ヒドロキシ-MeLeu}]^{\oplus}$  - 「シクロスポリン」も活性化合物である。

※50 【0024】この発明はまた、式ⅠⅠ、

11

12

[化8]



【式中、W'、X、R、Y、およびZは上記で定義されたとおりである。但し1) YがYがMeLeuまたはMeAlaであるとき、ZはMeValまたはMeLeuであり、2) W'がMeBmtであるとき、RがSarで、Yがγ-ヒドロキシ-MeLeuであるとき、ZはVal以外である】で示される化合物である、新規活性化合物を提供する。

【0025】新規活性化合物の好ましい群は式II、

【式中、XはX'、YはY'、ZはZ'である。但しW'がMeBmt、Y'がγ-ヒドロキシ-MeLeu以外である】で示される化合物から成る。

【0026】特に好ましい新規活性化合物は、上記の化合物a)、b)、c)、d)、f)、およびh)である。これらの化合物のある物、例えば化合物b)およびc)は、シクロフィリンとの結合を遮断することによって「シクロスポリン」の免疫抑制作用を遮断し、「シクロスポリン」キック抗剤として作用することがわかっている。

【0027】活性化合物は、下記のように分類される様々な方法で得ることができる。

- 1) 発酵
- 2) 生体内変換
- 3) 誘導化
- 4) 部分的合成
- 5) 全合成

【0028】1) 活性化合物のあるものは、下記の実施例1に記載されている化合物c)の生成に例示されるように、トリポクロジウム・インフラツム・ガムズ (*Tolypocladium inflatum* Gams) などの「シクロスポリン」産成生物のものとまたは修飾菌株の発酵の副産物として生成される。

【0029】2) 既知の化合物j)およびl)を含む他の活性化合物は、「シクロスポリン」の代謝物であり、クロマトグラフィーの方法で「シクロスポリン」を投与されたヒトまたは動物の尿から単離し得る。さらに、例えば実施例2に記載されているシクロスポリンAの生体内変換による化合物e)およびg)の生成、シクロスポリンGの生体内変換による化合物f)の生成(実施例4)のように、これらおよび他の代謝的変換は微生物を使うことが可能である。これらの実施例は、1種またはそれ以上のMeLeu残基をもつシクロスポリンを加えて、セベキア・ベニハナ (*Sebekia benihana*) の新規修飾菌株を培養し、生成物を発酵ブロスから単離する方法を含む、1種またはそれ以上のγ-ヒドロキシ-MeLeu残基をもつシクロスポリン類の新規製造方法を提

示する。

【0030】誘導化という語は、天然または合成シクロスポリン類を、ペプチド結合を開裂したり再生したりする事なく1種またはそれ以上のアミノ酸を修飾する、1種またはそれ以上の化学反応によって、活性化化合物に変換することを意味している。例えば、実施例5中の化合物h)および実施例6中の化合物i)に例示されているように、5位のValがN-アルキル化されている活性化化合物群を、5位のValを持つ対応するシクロスポリンをブチルリチウムと反応させ、その後アルキル化剤と反応させることによって得ることができる。

【0031】他の例では、化合物a)を化合物e)(実施例7)の水素化によって製造することができ、「シクロスポリン」の主な代謝物である化合物j)を実施例8に記載されているような既知の化合物、酢酸シクロスポリンから製造することができる。

【0032】4) 半合成という用語は、天然シクロスポリンの環を開き、1種またはそれ以上のアミノ酸を除去し、異なるアミノ酸を加え、環を再び閉じる一連の化学反応を意味するのに使用される。

【0033】5) シクロスポリンの全合成を、ウエグナー(引用文中)による記載、米国特許第4396542および第4798823にみられるように、線状ウンデカペプチドを作り、環化することによって実施することが出来る。原則として、どのシクロスポリンも、全合成の手段で製造されるが、他の方法の1つが可能であればそれは全合成より便宜的である。全合成は化合物d)(実施例9)および既知の代謝化合物l)の製造に使用され得る。

【0034】化合物k)はケスノーら(モルキュラー・イムノロジー (Mol. Immunol.), 24巻, 1159, 1987年)によってその属性が記載されている既知の物質であるが、これも全合成により製造され得る。例えば、この化合物の全合成は米国特許第4914188号に記載されている。

【0035】実施例1 [Me Ile]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」(化合物c)菌株生成

化合物c)を、1991年7月24日のブダペスト条約の規定の下に、受託番号DSM6627で、ドイツ・ザムルンク・フル・マイクロオルガニズメン (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen) に寄託されている、真菌の菌株トリポクラジウム・インフラツム (*Tolypocladium inflatum*) Cy E 4556の発酵によって得る。この菌株はトリポクラジウム・インフラツ

## 13

ム (*Tolypocladium inflatum* Gams) 種の菌株 NRRL 8044 の突然変異体であり、親菌株と系統的に同一であるが、これについては英国特許第 1491509 号などに、全て記載されている。

【0036】培養 1. 寒天出発培養: 菌株 DSM 6627 の寒天斜面培養を、下記の寒天培地で 27℃ で 14 日間成長させる。

イースト抽出物 (ジステックス) 4 g

モルト抽出物 (ワンダー) 20 g

寒天 20 g

脱塩水を加えて 1000 ml にする。培地は pH 5.4-5.6 であり、120℃ で 20 分滅菌する。

【0037】2. 前培養: 4 つの出発培養の菌株からの胞子を 0.9% の塩水 40 ml 中に懸濁する。各々が 100 ml の前培養培地を含むエルレンマイヤーフラスコの各々にこの懸濁液を 20 ml 接種する。前培地の組成は下記の通りである。

カゼイン (アンバー EHC) 25 g

マルトース 75 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g

KCl 2.5 g

脱塩水を加えて 1000 ml にする。培地を HCl で pH 5.2-5.5 に調整し、120℃ で 20 分間滅菌する。前培養菌を、50 mm の離心率、200 rpm の回転振とう器中、27℃ で 24 時間発酵させる。

【0038】中間培養: 20 リットルの前培養培地を入れた 25 リットルのスチール発酵器に 200 ml の前培養菌を接種する。中間培養菌を、攪拌率 150 rpm、1 リットルの培地あたり 0.5 パールの圧力で 0.5 リットル/分の気流中、27℃ で 5 日間発酵させる。

【0039】3. 主培養: 100 リットルの前培地に、10 リットルの中間培養菌を接種し、120 リットルのスチール発酵器で発酵させる。この培地に 4 g の D-スレオニンを加え、濾過により滅菌する。発酵を、最初の 5 日間は攪拌率 70 rpm、1 リットルの培地あたり 0.5 パールの圧力で 0.4 リットル/分の気流で、残りの発酵期間は攪拌率 100 rpm、気流 0.5 l/分に増やして 14 日間実施する。

【0040】単離: 菌糸体を培地から分離し、ターラックス器中で、10 リットルのメタノール/水 (9:1 の体積で) で 3 回破碎、攪拌することによって抽出する。破碎された菌糸体を吸引濾過によって溶媒から分離し、濾過物を合わせて 40℃ の真空中で蒸気がおもに水だけから成るまで蒸発させることによって濃縮する。得られた混合物を、各抽出で 2 リットルの 1, 2-ジクロ\*

## 14

\*ロエタンを使って 4 回抽出し、1, 2-ジクロロエタン溶液を合わせて 40℃ の真空下で蒸発によって濃縮する。

【0041】残留物を、酢酸エチル/水を溶離剤 (2.5 リットルの留分) として使って、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付す。(10 kg のシリカゲル、粒状化サイズ 0.02-0.045 mm, “グレース (Grace)” ) [Meile] <sup>4</sup>-シクロスポリンを含む留分 20-23 をプールし、さらに、クロロホルム/メタノール (98:2 の体積で) を溶離剤として (留分サイズ 300 ml) 使ってシリカゲルカラムクロマトグラフィー (600 g のシリカゲル、粒状化サイズ 0.04-0.063 mm, “メルク (Merck)” ) によって分離する。塩化メチレン/メタノール (98:2 の体積で) を溶離剤として使って (留分サイズ 200 ml) シリカゲルカラムクロマトグラフィー (400 g のシリカゲル、粒子サイズ 0.04-0.063 mm, “メルク”) によりさらに精製し、純粋な [Meile] <sup>4</sup>-シクロスポリンを無定形の白色粉として得る。融点 155-158℃; [α] <sub>20</sub>/D = -235 (CHCl<sub>3</sub> 中、c = 0.68) および -193 (CH<sub>3</sub>OH 中、c = 0.74)

【0042】CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> における IR スペクトルは、図 1 に見られる通りであり、CDCl<sub>3</sub> におけるプロトン NMR スペクトルは図 2 の通りである。

【0043】実施例 2 [γ-ヒドロキシ-MeLeu] <sup>4</sup>-「シクロスポリン」(化合物 e)

化合物 e を、微生物セベキア・ベニハナ (*Sebekia benihana*) による「シクロスポリン」の生体内変換によって得る。使用される元の菌株は NRLL 11111 と名付けられ、セベキア・ベニハナ (*Sebekia benihana*) 種に属する。(ジェツトリ: セベキア (*Sebekia*), アクチノプラナシア科の新属。第 82 回 アニユアル・ミーティング・オブ・アメリカン・ソサエティ・オブ・マイクロバイオロジー (Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol.) アトランタ、1982 年、要旨、163 頁) この菌株はノボビオシンを水酸化することができ。化合物 e およびその関連の化合物の製造のために副次培養された菌株は、ジャーマン・コレクション・オブ・マイクロオーガニズムズ (German Collection of Microorganisms) (D-3300 ブラウンシュヴァイク) に DSM 6182 の番号で寄託されている。

【0044】1. 寒天出発培養: 菌株 DSM 6182 の寒天斜面培養を 27℃ で 10 日間下記の寒天培地で行なう。

グルコース	10 g
デンプン (可溶性)	20 g
イースト抽出物 (ジステックス)	5 g
ペプトン (N-Z-アミン A 型、シェフィールド)	5 g
CaCO <sub>3</sub>	1 g



15

寒天 (バクト)

脱塩水を加えて1リットル

pH: NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で7に中和される。

滅菌: 120℃/20分

2. 前培養: 1つの出発培養物の孢子および菌糸体を10mlの0.9%塩水で懸濁する。各々50mlの前\*

グルコース

デンプン (可溶性)

イースト抽出物 (ギステックス)

麦芽抽出物 (液、ワンダー)

ペプトン (N-ZアミンA型、シェフィールド)

CaCO<sub>3</sub>

微量成分溶液235番

脱塩水を加えて1リットル

pHをNaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で7に中和する。

微量成分溶液235番

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>FeSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O

KI

CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>OCuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>OMnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>OZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O

脱塩水を加えて999mlにする。

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (97%)

前培養物を27℃で4日間、200rpm、50mmの離心率の回転振とう器で発酵させる。

【0045】3. 中間培養: 各々50mlの前培養地を含む、直列の200mlのエrlenマイヤーフラスコの各々に5mlの前培養物を接種する。中間培養物を3日間27℃で200rpmで離心率50mmの回転振とう器で発酵する。

【0046】4. 主培養: 各々が50mlの主培養培★

セルロース

デキストリン

デンプン (可溶性)

イースト抽出物 (ギステックス)

大豆粉 (ヌルパン、エーデルソヤ)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>OCaCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O

微量元素AC-1

脱塩水を加えて1リットルにする。

pH: 7.2-7.5に調整する。(KOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

滅菌: 120℃/20分

微量元素溶液AC-1: この溶液は、(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 0.2gを加えた235番溶液と同じ組成をもつ。

16

18g

\* 培地を含む一連のエrlenマイヤーフラスコの各々にこの懸濁液を5mlづつ接種する。前培養培地の組成は下記の通りである。

7g

10g

4.5g

10g

2.5g

1g

1ml

※ ※滅菌: 120℃/20分

0.1g

5g

0.05g

2g

0.2g

2g

4g

1ml

★地を含む直列の500mlエrlenマイヤーフラスコの各々に5mlの中間培養物を接種する。これらの培養物を3日間、27℃で200rpm、離心率50mmの回転振とう器で発酵させる。24時間後、メタノールに溶けたシクロスポリンA (7.5mg) を各主培養物 (= 150mg/L) に加える。主培養培地の組成は下記の通りである。

10g

10g

10g

2.5g

12.5g

0.25g

0.12g

0.10g

0.05g

1ml

☆【0047】5. 単離: 菌糸体を培地から分離し、生成した培養濾過物 (13L) を1, 2-ジクロロエタンを各抽出に1.5L使用して3回抽出する。1, 2-ジクロロエタン溶液を合わせて40℃の真空下で蒸発させる。粗残留物を、メタノールを溶離剤として使用してセファデックス (Sephadex) LH-20ゲル濾過に処

☆50

17

す。シクロスポリン化合物(525mg)を含むそれらの留分をプールし、クロロホルム/メタノールを溶離剤として使用してシリカゲル(50g、粒状化サイズ0.04-0.063mm、'メルク')上でクロマトグラフィーに付す。同じ方法を使ってクロマトグラフィーを繰り返して、無定形の白色粉として純粋な[ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」を得る。融点、150-153℃、 $[\alpha]_D^{20}$ -225(CHCl<sub>3</sub>中、c=0.53)、-171(CH<sub>3</sub>OH中、c=0.44)

【0048】実施例3 [ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」(化合物g)

[ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」の精製で生じる極性が強い副留分を、2:1のアセトン/ヘキサンを溶離剤として使用してシリカゲルカラムクロマトグラフィー(粒状化サイズ0.04-0.063mm)を繰り返し90:9:1のメチル $\alpha$ -ブチルエーテル/メタノール/水を溶離剤として使用するシリカゲル上のクロマトグラフィーによってその後分離する。最初の留分は[ $\gamma$ -ヒドロキシ-Leu]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」を含むが、それを炭で脱色させてさらに精製し、無定形の白色粉として純粋な化合物を得る。融点162-164℃、 $[\alpha]_D^{20}$ -211(CHCl<sub>3</sub>中、c=0.50)、-157(CH<sub>3</sub>OH中、c=0.52)

【0049】上記のシリカゲルカラムクロマトグラフィーからの後期の留分は、[ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu]<sup>4</sup>-[ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu]<sup>6</sup>-「シクロスポリン」を含み、炭で脱色してさらに精製し、純粋な標 30  
題の化合物を無定形の白色粉として得る。融点157-160℃、 $[\alpha]_D^{20}$ -217(CHCl<sub>3</sub>中、c=0.54)、-176(CH<sub>3</sub>OH中、c=0.42)

【0050】実施例4 [Nva]<sup>2</sup>-[ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」(化合物f)  
この化合物は化合物e([ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」)の製造と同様の方法で製造されるが、出発物質としてシクロスポリンG([Nva]<sup>2</sup>-「シクロスポリン」)を使用する。溶離剤として水飽和酢酸エチルおよび2:1のアセトン/ヘキサン 40  
を使用してシリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返して精製した後、標題の化合物を無定形の白色粉として得る。融点138-141℃、 $[\alpha]_D^{20}$ -213(CHCl<sub>3</sub>中、c=0.69)、-168(CH<sub>3</sub>OH中、c=0.70)

【0051】実施例5 [MeVal]<sup>5</sup>-「シクロスポリン」(化合物h)

テトラヒドロフラン中に溶解したシクロスポリンA

(0.60g=0.5mmol)を、ヘキサン中の1.6Mブチルリチウム溶液(1.0mmol)0.63m 50

18

lとインキュベートする。生成溶液を-78℃でジメチル硫酸エステル(0.1ml;1.5mmol)と反応させる。反応混合物をゆっくりと室温にまで温め、1晩撹拌する。

【0052】フラッシュクロマトグラフィー(SiO<sub>2</sub>、5%メタノール/エタノール)による単離の後、HPLC(逆相)によって標題の生成物を得る。化合物を、図3に示されているCDC1<sub>3</sub>中の300MHzの<sup>1</sup>H NMRスペクトルで確認する。

10 【0053】実施例6 [MeOThr]<sup>2</sup>-[(D)MeAla]<sup>3</sup>-[MeVal]<sup>5</sup>-「シクロスポリン」(化合物i)

480mlのTHF(無水)および6.96g(49.2mmol)のジイソプロピルアミンの混合物を-80℃まで冷却し、ヘキサン中の1.33Mのブチルリチウム溶液33.5mlをゆっくりとシリンジを通して加える。混合物を-80℃で30分間撹拌し、120mlの無水THF中の8gのシクロスポリンC([Thr]<sup>2</sup>-「シクロスポリン」)溶液をシリンジを通して2-3 20  
分間に加える。透明な溶液を-80℃でさらに1時間撹拌し、2.06mlのヨードメチルをゆっくりと加える。

【0054】混合物を2時間以上室温にまで温めておき、40mlの水を加え、溶媒を回転蒸発器で30℃/15mmHgで蒸発させる。残基を水とエーテルに分割し、エーテル層を半飽和食塩で4回洗浄し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥し、蒸発させ、8.1gの残留物を得る。

【0055】残留物を水飽和酢酸エチルを含む1200gのけいそう土上でクロマトグラフィーに付して粗生成物を得、さらにそれを5%のMeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>を含む200gのけいそう土上でクロマトグラフィーに付して純粋な標題の生成物、 $[\alpha]_D^{20}$ -195(CHCl<sub>3</sub>中、c=1.0)を得る。

【0056】実施例7 [ジヒドロ-MeBmt]<sup>1</sup>-[ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」(化合物a)

4mlのエタノール中の200mgの前水素化された10%のパラジウム/炭素の懸濁液に、10mlのエタノール中の1.2gの[ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」(化合物e)を加え、室温で、水素が取り込まれなくなるまで水素化を実施する。濾過による触媒の除去の後、溶液を蒸発させ、標題の化合物を白色粉として得る。融点、154-156℃、 $[\alpha]_D^{20}$ -225(CHCl<sub>3</sub>中、c=0.87)、-169(CH<sub>3</sub>OH中、c=0.70)

【0057】実施例8 [8'-ヒドロキシ-MeBmt]<sup>1</sup>-「シクロスポリン」(化合物j)

1. [0-アセチル- $\omega$ -ブromo-MeBmt]<sup>1</sup>-「シクロスポリン」: 25.0g(20mmol)の [0-アセチル-MeBmt]<sup>1</sup>-「シクロスポリン」

19

(トレーバーら、ヘルベチカ・キミカ・アクタ、65巻、1982年、1653頁)、4.4g (25mmol) のN-ブロモスクシンイミドおよび250mlの四塩化炭素中の400mgのアゾビスイソブチロニトリルの混合物を還流温度で2.5時間加熱する。溶媒を蒸発し、エーテルで置換し、固体を濾去し、水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、乾固するまで蒸発する。残留物をエチルエーテル/酢酸エーテル(4:1)でシリカゲルクロマトグラフィーに付して、10.7g (40%)の無定形の生成物を得、それをエーテル/ヘキサンから結晶化して8.4gの純粋な物質を得る。融点、207-209℃。クロマトグラフィーの後期の留分はわずかに質の劣った11.2gの生成物を含む。

【0058】2. [O-アセチル- $\omega$ -アセトキシ-MeBmt]<sup>1</sup>-「シクロスポリン」：ヨウ化ナトリウムの触媒量を含む、方法1の生成物(概算15-20%の開始物質を混入した)4.31g (3.31mmol) およびメチルエチルケトン30ml中の酢酸テトラエチルアンモニウム2.1g (8mmol)の混合物を油浴で105℃で3時間加熱する。溶媒をt-ブチルメチルエーテルで希釈し、水および食塩水で洗浄する。有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、蒸発して4.0gの粗生成物を残し、それをRP-18の逆相カラム(240g)で精製して3.07gの標題の生成物を得る。融点191-192℃

【0059】3. [ $\omega$ -ヒドロキシ-MeBmt]<sup>1</sup>-「シクロスポリン」：75mlのメタノール中の方法2の生成物1.72g (1.3mmol) 溶液および50mlのメタノール中の1.2gのナトリウム溶液を混合し、室温に2.5時間おく。次に溶液を酢酸で酸性化する。溶媒を減圧下で蒸発し残留物をt-ブチルメチル

20

\*ルエーテル中に溶解し、連続して水、食塩水、重炭酸ナトリウム溶液で洗浄し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥し、蒸発する。粗生成物(1.6g)をRP-18カラム(240g)から75:15のメタノール/水で溶離し、1.5gの純粋な生成物を得る。サンプルをエーテル/ヘキサンから結晶化して融点181-183℃の結晶生成物を得る。

【0060】実施例9 [MeThr]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」(化合物d)

10 米国特許第4396542および4798823に記載されているシクロスポリンの全合成を4位のMeLeuの代わりにMeThrを使って実施する。生成物は[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>=-249.6(CHCl<sub>3</sub>中、c=1.0)をもつ。

【0061】実施例10 [MeVal]<sup>4</sup>-「シクロスポリン」(化合物b)

20 米国特許第4396542および4798823に記載されているシクロスポリンの全合成を4位のMeLeuの代わりにMeValを使って実施する。生成物は[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>=-226(CHCl<sub>3</sub>中、c=0.358)を持つ。

【0062】実施例11 「シクロスポリン」に関連する活性物質の免疫抑制およびシクロフィリン結合表Iは(1)ELISAアッセイで測定された活性物質のシクロフィリン結合率(BR)および(2)MLRアッセイで測定され、「シクロスポリン」関連活性のパーセンテージ(免疫抑制率、IR)で表わされた「シクロスポリン」関連活性化合物の免疫抑制活性の実施例を示している。これらの価の意味およびこれらの試験の実施方法の詳しい説明は上記に示されている。

表I

化合物	BR (log <sub>10</sub> )	IR (%)
a) [ジヒドロ-MeBmt] <sup>1</sup> -[ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu] <sup>4</sup> -「シクロスポリン」	0.1	<1
b) [MeVal] <sup>4</sup> -「シクロスポリン」	0.1	<1
c) [MeIle] <sup>4</sup> -「シクロスポリン」	-0.2	<1
e) [ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu] <sup>4</sup> -「シクロスポリン」	-0.3	<1
f) [Nva] <sup>2</sup> -[ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu] <sup>4</sup> -「シクロスポリン」	0.4	<1
h) [MeVal] <sup>5</sup> -「シクロスポリン」	0.4	5.3
j) [8'-ヒドロキシ-MeBmt] <sup>1</sup> -「シクロスポリン」	0.35	1.8
k) [MeAla] <sup>5</sup> -「シクロスポリン」	-0.4	3.2
l) [ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu] <sup>5</sup> -「シクロスポリン」	0.15	2.9

【0063】実施例12 活性化合物の抗-HIV活性および細胞毒性

MT4-細胞中のHIV複製の抑制剤としての活性化合物※50

※物および「シクロスポリン」の活性およびMT4-細胞中の活性化合物および「シクロスポリン」の細胞毒性の実施例を表IIに示す。これらの数字の意味および適当

21

22

な方法は上記で論じている。

\* \* [0064]

表I I

化合物	細胞毒性 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	抗HIV ( $\text{IC}_{50}$ )
a) [ジヒドロ-MeBmt] <sup>1</sup> -[ $\gamma$ -ヒドロキシ -MeLeu] <sup>4</sup> -「シクロスポリン」	16.3	0.12
b) [MeVal] <sup>4</sup> -「シクロスポリン」	5.4	0.064
c) [MeIle] <sup>4</sup> -「シクロスポリン」	4.5	0.056
e) [ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu] <sup>4</sup> - 「シクロスポリン」	15.5	0.34
f) [Nva] <sup>2</sup> -[ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu] <sup>4</sup> - 「シクロスポリン」	14.0	0.85
h) [MeVal] <sup>5</sup> -「シクロスポリン」	4.4	0.45
i) [MeOThr] <sup>2</sup> -[(D)MeAla] <sup>3</sup> - [MeVal] <sup>5</sup> -「シクロスポリン」	>10	0.45
j) [8'-ヒドロキシ-MeBmt] <sup>1</sup> - 「シクロスポリン」	10.6	0.56
k) [MeAla] <sup>6</sup> -「シクロスポリン」	5.2	1.34
l) [ $\gamma$ -ヒドロキシ-MeLeu] <sup>8</sup> - 「シクロスポリン」	>10 8.45	0.31 0.53

【0065】 活性化化合物は症候のないHIV-陽性患者におけるAIDSの予防およびAIDSに罹患している患者の処置の両方に指示されている。AIDSが発症している患者において、活性化化合物の投与はAIDSに関連するT4-細胞消耗を還元し、カポジ肉腫のようなAIDS関連障害の退行を誘導し、新しい日和見感染の可能性を減らすはずである。

【0066】 従って、この発明は、処置を必要とする対象または患者に活性化化合物の有効な量を投与することを  
30 含む、後天性免疫不全症候群およびこのウイルスに感染した患者でのHIV-1ウイルスによって誘導される他の病気の処置および予防の方法およびそのための予防治療剤（処置剤）または組成物を提供する。

【0067】 活性化化合物は通常の経路、特に経口などの腸経由、飲むための溶液、錠剤、カプセルの形で、または例えば注射液またはけんだく化剤などの形などでの非経口で投与することが出来る。静脈経由での指示される1日の用量は1から20mg/kg、好ましくは3から10mg/kgであり得、経口で1から50mg/kg  
40 g、好ましくは7から20mg/kgであり得る。

【0068】 活性化化合物の毒性は「シクロスポリン」のそれと同様であると思われる。活性化化合物が免疫抑制的でないの、免疫抑制に関連する「シクロスポリン」のある種の副作用は避けられる。しかしながら、「シクロスポリン」に関連する他の副作用は、特に長期の使用における腎毒性はまた、活性化化合物と関連し得る。

【0069】 活性化化合物の好ましい製剤は、英国特許出願2222770Aに記載されているようなマイクロエマルジョンに基づくものを含み、局所および経口型、英国※50

※特許出願2209671Aに記載されているモノラウリン酸サッカロースなどのサッカリド脂肪酸モノエステルを含む固溶体から得られた経口および注射型を含む。経口投与のための好ましい単位用量形態は、例えば一回量あたり25から200mgの活性化化合物を含む。

## 製剤例A

実施例1の生成物	50.0mg
グリコフロール75	180.0mg
ミグリオール812	90.0mg
クレモホール RH40	180.0mg
アルファトコフェロール	0.5mg

## 製剤例B

実施例1の生成物	100.0mg
テトラグリコール	20.0mg
キャプテックス800	20.0mg
ニッコールHCO-40	860.0mg
ブチルヒドロキシトルエン (BHT)	1.0mg

## 製剤例C

実施例1の生成物	25.0mg
グリコフロール	100.0mg
ミグリオール 812	35.0mg
クレモホールRH40	90.0mg
ブチルヒドロキシアニゾール (BHA)	0.2mg

## 製剤例D:

実施例1の生成物	10.0mg
テトラグリコール	10.0mg
ミリトール	5.0mg

23

クレモホル RH40 75.0mg

アルファートコフェロール 0.1mg

これらの製剤の各々の化合物、およびそれらの製造方法は、英国特許出願2222770に全て記載されており、ここに引用してその内容をこの明細書に包含させる。

【図面の簡単な説明】

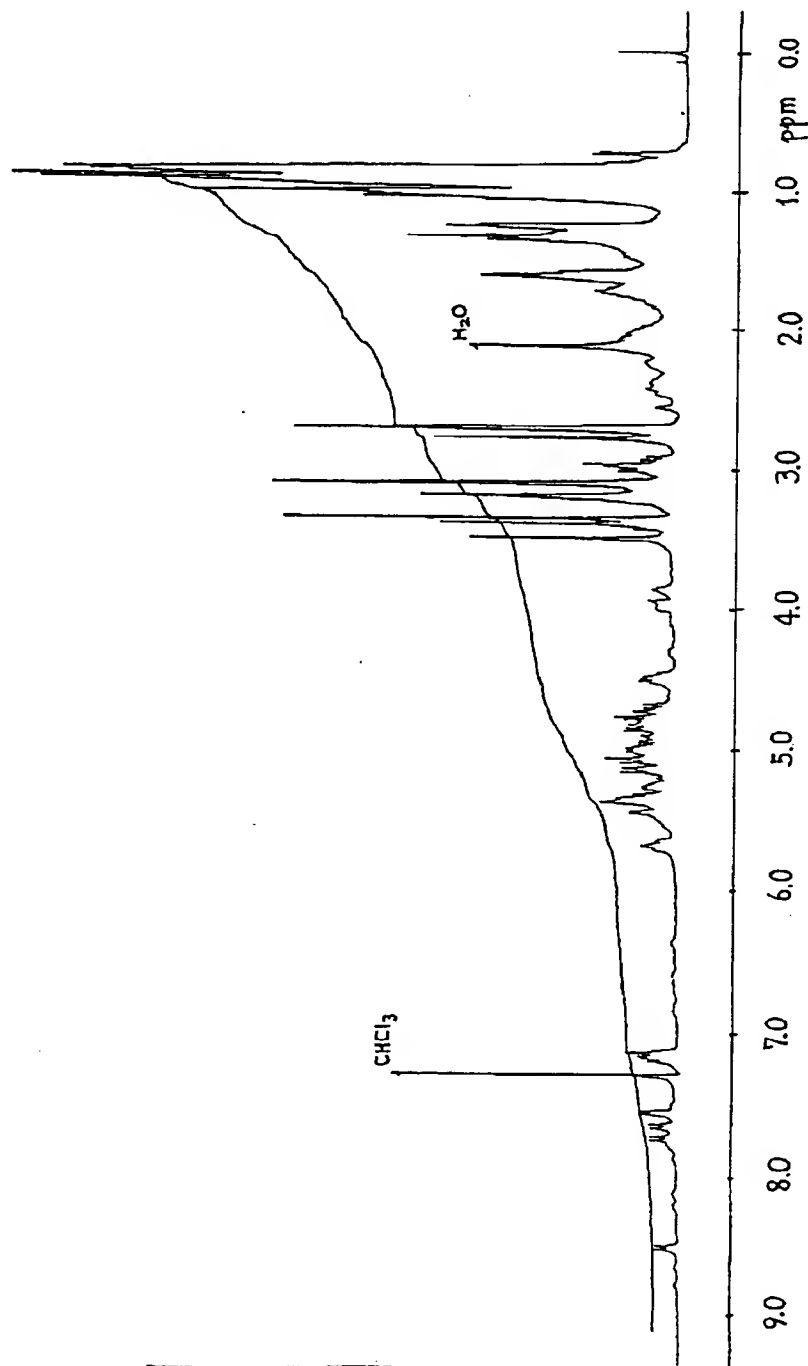
24

【図1】 実施例1で得られる化合物のIRスペクトルである。

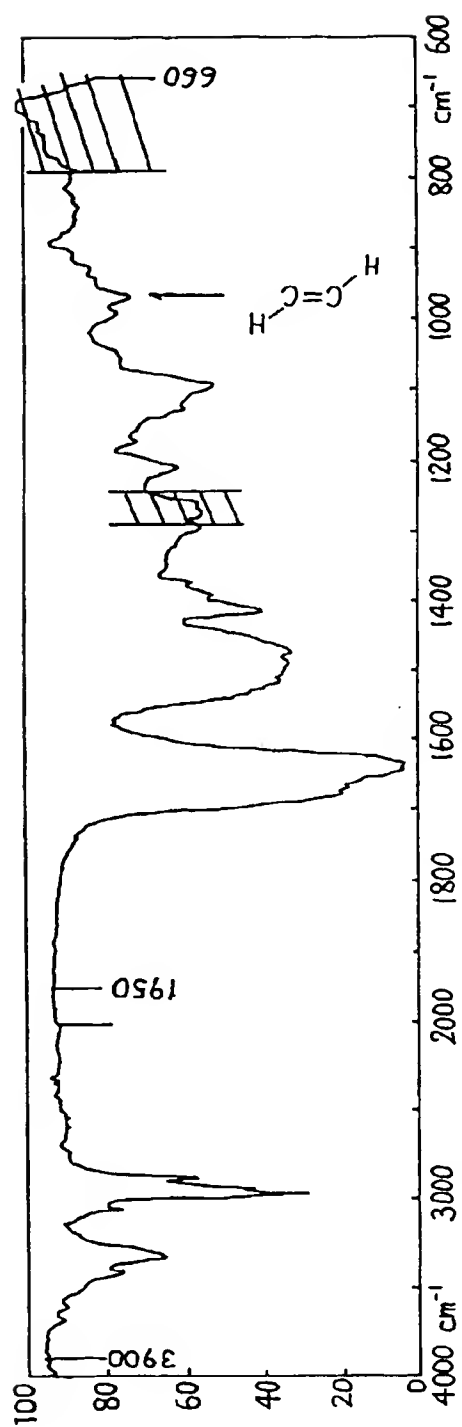
【図2】 実施例1で得られる化合物のNMRスペクトルである。

【図3】 実施例5で得られる化合物のNMRスペクトルである。

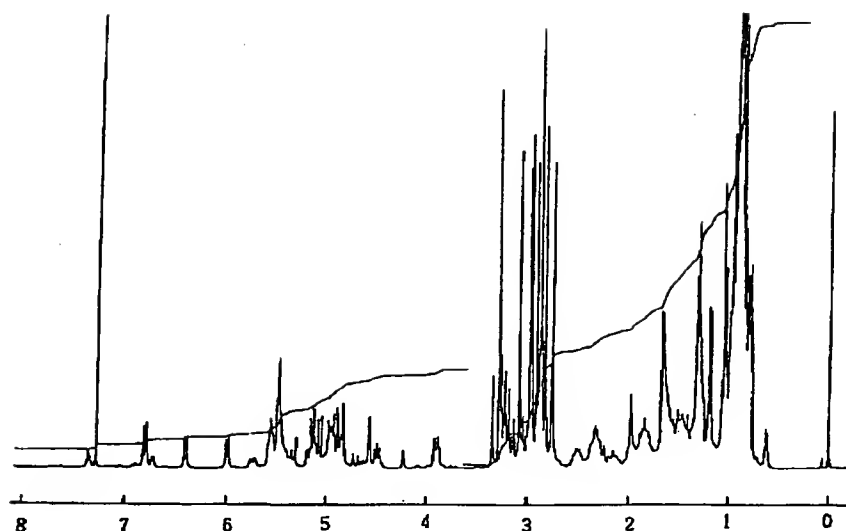
【図2】



〔図1〕



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/02	A 8214-4B			
// (C 1 2 N 1/14				
C 1 2 R 1:645)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:645)				
C 0 7 K 99:00				
(31)優先権主張番号 9 0 2 3 9 7 1 . 6	(72)発明者 ディーター・ゼーバッハ スイス8044チューリヒ、オレリシュトラ セ3番			
(32)優先日 1990年11月5日				
(33)優先権主張国 イギリス (GB)				
(31)優先権主張番号 9 1 1 6 8 3 6 . 9	(72)発明者 ルネ・ペー・トラベール スイス4052バーゼル、ヒルツボデンパルク 20番			
(32)優先日 1991年8月5日				
(33)優先権主張国 イギリス (GB)				
(72)発明者 ハンス・コーベル スイス4059バーゼル、ヴァイセンシュタイ ンシュトラセ1番	(72)発明者 ローラン・ヴェンガー スイス4125リーヘン、グレンツァヒェルヴ ェーク45番			
(72)発明者 ブリギッテ・ローゼンヴィルス オーストリア2340メドリンク、ツェー・ツ ヴィリングガッセ17番				
	(72)発明者 ピエトロ・ボーリング スイス4103ボットミンゲン、グスタッセル シュトラセ56番			